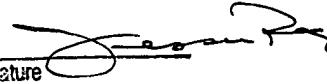




EXPRESS MAIL CERTIFICATE

767726417
Date 10/15/01 Label No. _____
I hereby certify that on the date indicated above, this paper or
file was deposited with the U.S. Postal Service & that it was
addressed for delivery to the Assistant Commissioner for Docket No.: 6181/OJ707
Patents, Washington, DC 20231 by "Express Mail Post Office
to Addressee" service.

Jessica Roys 
Name (Print) Signature

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of: Joong Hyuck AUH et al.

Serial No.: 09/938,334

Confirmation No.: 9995

Filed: August 23, 2001

For: COMPOSITION FOR DETECTING BETA-1,3-GLUCAN, PREPARATION
METHOD THEREOF AND DIAGNOSTIC KIT DETECTING BETA-1,3-
GLUCAN

CLAIM OF PRIORITY

Hon. Commissioner of
Patents and Trademarks
Washington, DC 20231

Sir:

Applicant hereby claims priority under 35 U.S.C. Section 119 based
on Korean Application No. 2000-0002542, filed January 20, 2000.



Serial No. 09/938,334
Docket No.: 6181/OJ707

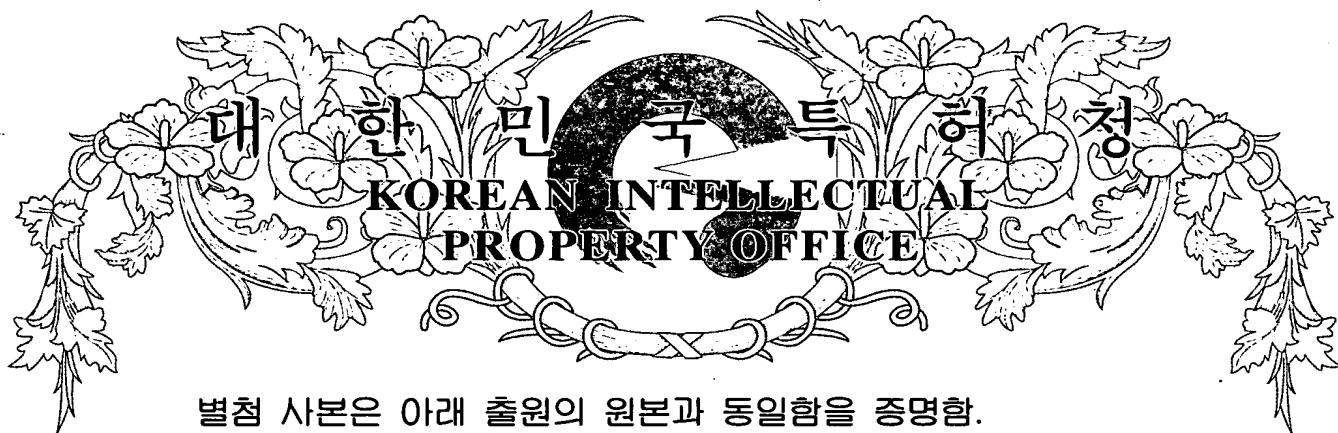
A certified copy of the priority document is submitted herewith.

Respectfully submitted,

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Peter Ludwig".

S. Peter Ludwig
Reg. No. 25,351
Attorney for Applicant(s)

DARBY & DARBY P.C.
805 Third Avenue
New York, New York 10022
212-527-7700



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출 원 번 호 : 특허출원 2000년 제 2542 호
Application Number PATENT-2000-0002542

출 원 년 월 일 : 2000년 01월 20일
Date of Application JAN 20, 2000

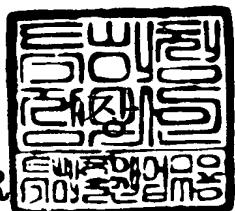
출 원 인 : 주식회사 삼양제넥스
Applicant(s) SAMYANG GENEX CORPORATION



2001 년 08 월 29 일

특 허 청

COMMISSIONER



【서지사항】

| | |
|------------|---|
| 【서류명】 | 특허출원서 |
| 【권리구분】 | 특허 |
| 【수신처】 | 특허청장 |
| 【참조번호】 | 0107 |
| 【제출일자】 | 2000.01.20 |
| 【국제특허분류】 | A61K |
| 【발명의 명칭】 | 진균감염 진단용 조성을 및 그것의 제조방법 |
| 【발명의 영문명칭】 | Composition for detecting fungal infection and diagnosis kit therefor |
| 【출원인】 | |
| 【명칭】 | 주식회사 삼양제넥스 |
| 【출원인코드】 | 1-1998-002549-0 |
| 【발명자】 | |
| 【성명의 국문표기】 | 이복률 |
| 【성명의 영문표기】 | LEE,Bok Kuel |
| 【주민등록번호】 | 541215-1101824 |
| 【우편번호】 | 609-752 |
| 【주소】 | 부산광역시 금정구 구서2동 189번지 선경아파트 7동 703호 |
| 【국적】 | KR |
| 【발명자】 | |
| 【성명의 국문표기】 | 홍기환 |
| 【성명의 영문표기】 | HONG,Ki Whan |
| 【주민등록번호】 | 380621-1100211 |
| 【우편번호】 | 601-010 |
| 【주소】 | 부산광역시 동구 초량동 931-34 |
| 【국적】 | KR |
| 【발명자】 | |
| 【성명의 국문표기】 | 이광문 |
| 【성명의 영문표기】 | LEE,Kwang Moon |
| 【주민등록번호】 | 660414-1829211 |
| 【우편번호】 | 614-070 |

| | |
|------------|---|
| 【주소】 | 부산광역시 부산진구 연지동 세동한신아파트 103-1908호 |
| 【국적】 | KR |
| 【발명자】 | |
| 【성명의 국문표기】 | 박종진 |
| 【성명의 영문표기】 | PARK, Chong Jin |
| 【주민등록번호】 | 620608-1539110 |
| 【우편번호】 | 305-390 |
| 【주소】 | 대전광역시 유성구 전민동 청구나래아파트 101동 302호 |
| 【국적】 | KR |
| 【발명자】 | |
| 【성명의 국문표기】 | 홍승서 |
| 【성명의 영문표기】 | HONG, Seung Suh |
| 【주민등록번호】 | 570921-1024413 |
| 【우편번호】 | 305-390 |
| 【주소】 | 대전광역시 유성구 전민동 462-2 청구나래아파트 109동 404호 |
| 【국적】 | KR |
| 【발명자】 | |
| 【성명의 국문표기】 | 이현수 |
| 【성명의 영문표기】 | LEE, Hyun-Soo |
| 【주민등록번호】 | 420623-1041310 |
| 【우편번호】 | 137-040 |
| 【주소】 | 서울특별시 서초구 반포동 550-18 제우하우스 101 호 |
| 【국적】 | KR |
| 【취지】 | 특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합 니다. 출원인 식회사 삼양제넥스 (인) |

1020000002542

출력 일자: 2001/8/30

【수수료】

| | | | | |
|----------|----|--------|--------|---|
| 【기본출원료】 | 19 | 면 | 29,000 | 원 |
| 【가산출원료】 | 0 | 면 | 0 | 원 |
| 【우선권주장료】 | 0 | 건 | 0 | 원 |
| 【심사청구료】 | 0 | 항 | 0 | 원 |
| 【합계】 | | 29,000 | 원 | |

【요약서】**【요약】**

본 발명은 시료내의 β -1,3-글루칸을 검출할 수 있는 조성물 및 그것을 제조하는 방법 및 진균 감염 진단용 키트에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 칼슘 존재하에서 β -1,3-글루칸에 의해 페놀옥시데이즈 활성을 나타내는 조성물로, 곤충의 체액 또는 플라즈마인 시료를 얻고, 얻어진 시료를 상기 시료 및 분리 공정에 존재하는 칼슘이온을 칼레이팅하기에 충분한 칼레이팅제를 함유하는 용매 또는 완충액으로 처리하여 분획을 얻고, 얻어진 분획 중 칼슘 이온 존재하에서 β -1,3-글루칸에 의해 페놀옥시데이즈 활성을 나타내는 분획을 선택하는 것에 의해 제조할 수 있다. 본 발명에 따른 조성물을 이용하여, 검체로부터 시료를 채취하고, 상기 시료에 본 발명에 따른 조성물과 칼슘 이온을 첨가하고, 상기 시료에서의 페놀옥시데이즈 활성을 측정함으로써 진균 감염을 진단할 수 있다.

【대표도】

도 1

【색인어】 β -1,3-글루칸, 진균 감염 진단제

【명세서】**【발명의 명칭】**

진균감염 진단용 조성물 및 그것의 제조방법{Composition for detecting fungal infection and diagnosis kit therefor}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 세파텍스 컬럼을 이용하여 갈색거저리에서 분리한 페놀옥시데이즈 조성물의, 칼슘 이온 및 β -1,3-글루칸 존재하에서의 페놀옥시데이즈 활성 그래프이다.

도 2는 Toyopearl 컬럼을 이용하여 갈색거저리에서 분리한 페놀옥시데이즈 조성물의, 칼슘 이온 및 β -1,3-글루칸 존재하에서의 페놀옥시데이즈 활성 그래프이다.

도 3은 한국산 참검정굼벵이 유충에서 분리한 페놀옥시데이즈 조성물의 칼슘 이온 및 β -1,3-글루칸 존재하에서의 페놀옥시데이즈 활성 그래프이다.

도 4는 암 환자의 혈액을 대상으로, 페놀옥시데이즈 조성물을 이용한 β -1,3-글루칸 검출 결과를 나타내는 그래프이다.

도 5는 종양 및 염증성 질환을 가진 환자의 혈액을 대상으로, 페놀옥시데이즈 조성물을 이용한 β -1,3-글루칸 검출 결과를 나타내는 그래프이다.

도 6은 candidiasis 환자를 대상으로, 페놀옥시데이즈 조성물을 이용한 β -1,3-글루칸 검출 결과를 나타내는 그래프이다.

【발명의 상세한 설명】**【발명의 목적】****【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】**

<7> 생물은 외부에서 침입한 세균이나 곰팡이 또는 상처 등의 외부 자극으로부터 자신을 보호하기 위하여 특유의 보호기전을 보유하고 있다. 이 중 곤충을 비롯한 무척추 동물의 면역계는 척추동물과는 달리 항체를 생성하는 능력이 없음에도 불구하고 외부의 병원균으로부터 자신을 보호할 뿐 아니라 외부 이물질이 침입했을 때 이를 인지하여 제거하는 능력을 보유하고 있는 것으로 알려져 있다.

<8> 곤충에서의 멜라닌 형성은 체내에 존재하는 페놀성 물질의 산화로 시작되는데, 이 과정에 작용하는 효소인 페놀옥시데이즈는 곤충의 체내에서 평상시에는 불활성 형태인 프로페놀옥시데이즈 형태로 존재하다가 외부 이물질에 의해 활성화되는 프로페놀옥시데이즈 연쇄 반응의 최종산물의 자극에 의해 최종 활성 형태인 페놀옥시데이즈로 전환되는 것으로 알려져 있다. 이러한 프로페놀옥시데이즈의 활성화는 세균의 세포벽 성분인 β -1,3-글루칸, 리포폴리사카라이드, 펩티도글리칸 등에 의하여 개시되는 것으로 보고되었다.

<9> 암 환자나 장기이식 수술환자, AIDS 환자 등 면역기능이 저하된 환자에게 전신 진균 감염증이 증가되는 사실은 의료계에서 심각한 문제로 대두되고 있으며, 이로 인한 사망률도 점점 증가되고 있다. 이러한 면역기능이 저하된 환자들에게 조기에 진균 감염 여부를 판단하여 적절한 항진균제를 투여하는 것은 매우 필 요한 조치이나 현재 조기 진균 감염 여부를 판단하는 것에 어려움이 있다.

<10> 한편, 가재나 어패류의 인공 양식에서 곰팡이가 양식조에 감염되면 가재나 어패류가 다량 피사하므로 이로 인한 양식업계의 경제적 피해가 심각하다. 이러한 경우에도 진균의 감염을 초기에 진단할 수 있다면 적절한 조치를 취할 수 있어 수산 양식을 효율을 향상시킬 수 있다.

<11> 환자 진단의 경우, 지금까지는 진균학적 방법 즉, 환자의 혈액을 채취하여 배양을 통해 진균의 감염 여부를 판단하고 있으나 이 방법은 배양 시간이 2-5일이 요구되어 치료시기를 맞추지 못하는 단점이 있다. 최근에 진균이 가진 항원을 이용하는 방법이나 진균의 대사산물을 이용한 진단 방법이 제시되었으나 후자의 경우 여러 대사산물을 모두 분석해야 할 뿐 아니라 진균 대사산물의 빈번한 변이 유도에 의해 그 감도나 정확도가 낮다는 문제점이 있다. 이러한 이유로 전신 진균 감염의 초기 단계에 감염 환자의 혈액중에 미량 존재하는 β -1,3-글루칸을 정확하게 인식하는 시스템을 찾기 위하여 많은 연구가 진행되었으며, Limulus 혈구 혼합물이 β -1,3-글루칸을 인식하여 혈액 응고현상을 유도하는 현상을 이용한 진균감염 진단 키트가 개발되었으나 가격이 비쌀뿐 아니라 Limulus는 희귀동물로 대부분의 국가에서 자연보호동물로 지정되어 있다는 문제점이 있다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<12> 본 발명은 진균 감염 진단용 조성물에 관한 것이다.

<13> 본 발명은 진균 감염 진단용 조성물의 제조방법에 관한 것이다.

<14> 본 발명은 진균 감염 진단 방법에 관한 것이다.

<15> 본 발명은 진균 감염 진단용 키트에 관한 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

<16> 본 발명은 시료내의 β -1,3-글루칸을 검출할 수 있는 조성물 및 그것을 제조하는 방법 및 진균 감염 진단용 키트에 관한 것이다.

<17> 본 발명에서 페놀옥시데이즈 시스템은 곤충 내에 존재하는, β -1,3-글루칸에 의해 페놀옥시데이즈로 활성화되는 시스템을 의미한다.

<18> 본 발명에서 페놀옥시데이즈 조성물은 페놀옥시데이즈 시스템 성분의 전부 또는 일부를 포함하며, 칼슘 이온 존재하에서 β -1,3-글루칸에 의해 페놀옥시데이즈 활성을 나타내는 조성물을 의미한다.

<19> 완전변태 곤충의 생체 내에는 프로페놀옥시데이즈가 존재하며, β -1,3-글루칸 또는 리포폴리사카라이드에 의해 활성화되는 캐스케이드반응에 의해 페놀옥시데이즈로 활성화된다. 일련의 캐스케이드 단계로 이루어지는 이 반응 시스템은 외부에서 침입한 병원균이나 이물질, 혹은 자신의 혈구 세포의 탈과립화반응에 의해 유도되는 내부인자 등에 의하여 쉽게 활성화되어 페놀옥시데이즈로 변화되어 카테콜아민류를 이용하여 멜라닌을 형성해 버린다. 따라서 이 반응 시스템을 생체 외로 분리할 수 없으며, 최근까지도 페놀옥시데이즈 캐스케이드 반응에 관여하는 단백질들을 분리할 수 없었다. 본 발명자들은 최근 페놀옥시데이즈 캐스케이드 반응에 관여하는 단백질 중 하나가 세린 프로테이즈 활성을 가지는 단백질임을 밝혔다(EJB vol. 257, 615-619 (1998)). 또한 페놀옥시데이즈 캐스케이드 반응에 관여하는 또 다른 단백질인 프로페놀옥시데이즈 및 페놀옥시데이즈의 구조를 밝혔다.(FEBS letters vol. 444, No. 2,3 255-259(1998))

<20> 본 발명은 칼슘 존재하에서, β -1,3-글루칸에 의해 페놀옥시데이즈 활성을 나타내는 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 방법은 곤충의 페놀옥시데이즈 시스템 전부 또는 일부를 포함하며, 그 예로 프로페놀옥시데이즈를 포함한다.

<21> 또한 본 발명은 칼슘 존재하에서, β -1,3-글루칸에 의해 페놀옥시데이즈 활성을 나타내는 조성물을 제조하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에서는 분리 공정 중 칼슘 이온의 생리적 작용을 차단할 수 있도록 함으로써 곤충의 체액 또는 플라즈마로부터 β -1,3-글루칸에 의해 활성화되는 페놀옥시데이즈 조성물을 분리하는 방법을 제공한다.

<22> 본 발명에서는 곤충에 존재하는 페놀옥시데이즈 시스템이 β -1,3-글루칸에 의해 활성화될 뿐 아니라, 칼슘 이온에 의해서도 활성화된다는 사실을 밝혔다. 따라서 곤충으로부터 페놀옥시데이즈 시스템을 분리하기 위해서는 β -1,3-글루칸 뿐 아니라 칼슘 이온을 제거하는 것이 필요하다. 이를 바탕으로 본 발명은 곤충 체액 또는 플라즈마로부터, 칼슘 이온 존재하에서 β -1,3-글루칸에 의해 페놀옥시데이즈 활성을 나타내는 조성물을 제조하는 방법을 제공한다.

<23> 본 발명의 방법은 곤충의 체액 또는 플라즈마인 시료를 얻고, 얻어진 시료를 상기 시료 및 분리 공정에 존재하는 칼슘이온을 킬레이팅하기에 충분한 킬레이팅제를 함유하는 용매 또는 완충액로 처리하여 분획을 얻고 얻어진 분획 중 칼슘 이온 존재하에서 β -1,3-글루칸에 의해 페놀옥시데이즈 활성을 나타내는 분획을 선택하는 것으로 이루어진다. 본 발명의 방법에서 시료를 킬레이팅제를 함유하는 용매 또는 완충액로 처리하여 분획을 얻는 공정은 예를 들어 컬럼 크로마토그래피에 의하여 수행될 수 있다.

<24> 본 발명에서 곤충은 체내에 페놀옥시데이즈 시스템을 가지고 있는 곤충을 의미하며, 완전변태 곤충이 바람직하다. 예로는 가재나 새우와 같은 갑각류, 딱정벌레목 등을 들 수 있다.

<25> 본 발명의 방법에서, 곤충의 종류에 따라 곤충의 체액 또는 플라즈마를 시료로 이용할 수 있다. 상기 시료 및 분리 공정에 존재하는 칼슘이온을 칼레이팅하기에 충분한 칼레이팅제로 종래에 알려져 있는 칼레이팅제는 특별한 한정없이 사용할 수 있으며, 예를 들어 EDTA, EGTA, 사이트르산 등을 사용할 수 있다. 칼레이팅제의 양은 대상 곤충 시료나 컬럼의 종류, 사용 용매 등 분리 공정 조건에 따라 달라질 수 있으며, 곤충 시료 및 분리 공정에 존재하는 칼슘이온을 칼레이팅하기에 충분한 양이면 된다. 따라서 이 분야의 통상의 전문가들은 과도한 실험 없이 칼레이팅제의 양을 결정할 수 있을 것이다.

<26> 본 발명에 따른 제조방법에서 사용할 수 있는 용매 또는 완충액의 종류는 특별히 한정되지 않으며, pH가 6.5 이하인 것이 바람직하다. pH가 6.5보다 높은 경우 페놀옥시데이즈 캐스케이드 반응의 한 성분인 세린 프로테이즈가 활성화되어 프로페놀옥시데이즈를 페놀옥시데이즈로 활성화시켜버리므로 본 발명에 따른 조성을 얻기 어렵다.

<27> 본 발명에서 곤충 시료를 칼레이팅제를 함유하는 용매 또는 완충액으로 처리하는 방법의 한예는 컬럼 크로마토그래피로, 레진을 충진시킨 컬럼에 곤충 시료를 로딩한 후 칼레이팅제를 함유하는 용매 또는 완충액으로 용출시켜 분획을 얻을 수 있다.

<28> 본 발명에서 사용할 수 있는 레진은 텍스트란을 원료로 하는 레진이나 비닐을 원료로 하는 레진이 바람직하다. 한 예로 Sephadex 또는 Toyopeal을 사용할 수 있다.

<29> 본 발명에 따른 조성물은 진균 세포벽 성분인 β -1,3-글루칸을 특이적으로 검출할 수 있으므로 진균 감염의 진단에 유용하다.

<30> 또한 본 발명은 검체의 진균 감염을 진단하는 방법에 관한 것으로, 본 발명의 방법은 검체로부터 시료를 채취하고, 상기 시료에 칼슘 이온 존재하에서 β -1,3-글루칸에 의해 페놀옥시데이즈 활성을 나타내는 조성물과 칼슘 이온을 첨가하고, 상기 시료에서의 페놀옥시데이즈 활성을 측정하는 것으로 이루어진다. 한 예로, 본 발명에 따른 방법에서 칼슘 이온 존재하에서 β -1,3-글루칸에 의해 페놀옥시데이즈 활성을 나타내는 조성물은 곤충의 체액 또는 플라즈마인 시료를 상기 시료 및 분리 공정에 존재하는 칼슘이온을 퀼레이팅하기에 충분한 퀼레이팅제를 포함하는 용매로 처리하여 얻어진 분획 중 칼슘 이온 존재하에서 β -1,3-글루칸에 의해 페놀옥시데이즈를 활성화시키는 분획을 선택하여 제조되는 조성물일 수 있다.

<31> 본 발명에 따른 진균 감염 진단 방법에서, 검체는 사람을 포함하는 동물일 수 있으며, 검체로부터 혈액을 채취하여 진균 감염을 진단할 수 있다. 또 다른 예로, 양식업에서는 양식장의 물을 채취하여 진균 감염을 진단할 수 있다.

<32> 진균 감염 진단의 특이성을 향상시키기 위해, 필요한 경우 검체 시료에 존재할 수 있는 리포폴리사카라이드를 제거하는 전처리를 할 수 있다. 예를 들어, 검체 시료를 폴리믹신(polymyxin)과 같이 리포폴리사카라이드와 특이적으로 결합하거

나 리포폴리사카라이드를 침전시킬 수 있는 물질로 처리함에 의해 리포폴리사카라이드 영향을 제거할 수 있다.

<33> 본 발명에서 진균 감염의 진단 방법에 이용될 수 있는 폐놀옥시데이즈 활성 측정 방법은, 기존에 알려진 폐놀옥시데이즈 측정 방법을 그대로 또는 변형시켜 이용할 수 있다. 한 예로 아래에 설명한 4-메틸카테콜/4-하이드록시프로필에틸에스테르(4-MC/4-HP)를 이용한 발색 반응이나 도파민을 이용한 멜라닌 형성 반응을 이용하여 흡광도를 측정함으로써 폐놀옥시데이즈 활성을 측정할 수 있으며, 이로부터 쉽게 초기 단계의 진균 감염을 진단할 수 있다.

<34> 또한 본 발명은 진균 감염 진단용 키트에 관한 것이다. 본 발명의 진균 감염 진단용 키트는 칼슘 이온 존재하에서 β -1,3-글루칸에 의해 폐놀옥시데이즈 활성을 나타내는 조성물을 함유한다. 한 예로, 본 발명에서 칼슘 이온 존재하에서 β -1,3-글루칸에 의해 폐놀옥시데이즈 활성을 나타내는 조성물은 곤충의 체액 또는 플라즈마인 시료를 상기 시료 및 분리 공정에 존재하는 칼슘이온을 킬레이팅하기에 충분한 킬레이팅제를 포함하는 용매로 처리하여 얻어진 분획 중 칼슘 이온 존재하에서 β -1,3-글루칸에 의해 폐놀옥시데이즈를 활성화시키는 분획을 선택하여 제조되는 조성물일 수 있다.

<35> 본 발명에서 사용하는 완충액 및 폐놀옥시데이즈 활성 측정 방법은 다음과 같다

<36> 항응고 완충액(pH 5.5): NaCl 15 mM, 트리소디움 사이트레이트 136 mM, 시트르산 26 mM, EDTA 20 mM

<37> IPS 완충액(pH 5.5): NaCl 150 mM, KC1 5 mM, 트리소디움사이트레이트 10 mM, EDTA 30 mM

<38> β -1,3-글루칸 용액: β -1,3-글루칸(curdlan, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) 1mg을 0.1N NaOH 1m1에 녹인 용액 10 μ l과 20mM 트리스 완충액(pH 8.0) 990 μ l을 혼합하여 만든 용액

<39> 4-MC/4-HP 발색 반응

<40> 농도별로 희석한 β -1,3-글루칸 용액 10 μ l에 폐놀옥시데이즈 조성을 30 μ l을 섞어 30 °C에서 5분간 전반응시키고 20 mM 트리스 완충액(pH 8.0) 439.5 μ l과 1M CaCl₂ 2.5 μ l, 250 mM 4-메틸카테콜(MC) 2 μ l, 62.5 mM 4-하이드록시프롤린 에틸에스테르(HP) 16 μ l을 넣어 총량이 500 μ l이 되도록 한 후 30°C에서 30분 반응시킨다. 여기에 20% 초산 500 μ l을 넣어 반응을 중지시킨 후 520 nm에서 흡광도를 측정하여 표준 곡선을 얻는다.

<41> 검체에서 채혈한 혈액을 원심분리하여 얻은 혈장을 시료로 사용하여 위와 동일한 방법을 수행하여 520 nm에서 흡광도를 측정한다. 표준곡선으로부터 시료내에 존재하는 β -1,3-글루칸의 양을 결정한다

<42> 멜라닌 생성 반응

<43> 희석한 β -1,3-글루칸 용액 10 μ l에 폐놀옥시데이즈 조성을 30 μ l을 섞어 30 °C에서 10분간 전반응시킨 후 0.02M 트리스 완충액(pH 8.0) 405 μ l, 1M CaCl₂ 5 μ l, 10mM 도파민 용액 50 μ l을 가하여 30°C에서 60 분 반응시킨다. 400 nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선을 얻는다. 검체에서 채혈한 혈액을 원심분리하여 얻

은 혈장을 시료로 사용하여 위와 동일한 방법을 수행하여 400 nm에서 흡광도를 측정한다. 표준곡선으로부터 시료내에 존재하는 β -1,3-글루칸의 양을 결정한다.

<44> 실시예 1.

<45> 딱정벌레목 갈색거저리(*Tenebrio molitor*)의 유충을 얼음 위에서 마취시키고 25 G 주사바늘이 연결된 5ml 멸균 주사기에 항응고 완충액을 채워 머리쪽 첫번째 마디에 찔러 유출되는 체액을 마리 당 3 방울씩 모았다. 채취한 체액 50 ml을 203,006 g 속도로 4 °C에서 4시간 원심분리한 후 상동액을 울트라필트레이션(cut off: 10,000)하여 3 ml까지 농축하였다. 세파덱스 G-100(Pharmacia)를 항응고 완충액에 혼탁시킨 후 1.5x50 cm 컬럼에 충진시키고 충분한 양의 항응고 완충액으로 컬럼을 세척하였다. 농축된 시료를 로딩하고 항응고 완충액을 0.2ml/분의 속도로 흘려주면서 용출액을 4 ml씩 모아 280 nm에서 흡광도를 측정하여 단백질 농도를 조사하였다. β -1,3-글루칸 용액을 사용한 4-MC/4-HP 발색 반응을 통해, β -1,3-글루칸이 있을 때 발색되는 분획만을 모아 폐놀옥시데이즈 조성물을 얻었다. 얻어진 폐놀옥시데이즈 조성물을 사용하여, Ca^{2+} 의 존재 또는 부존재 하에서 β -1,3-글루칸 검출 능력을 확인하였다. 즉, 최종 Ca^{2+} 농도를 각각 0 mM과 5 mM로 되도록 하고, β -1,3-글루칸 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 함유하는 시료 10 μl 을 사용하여 4-MC/4-HP 발색 반응을 수행하였다. 결과를 도 1에 나타낸다(■—■: 최종 칼슘 농도 5 mM + β -1,3-글루칸 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, □—□: 최종 칼슘 농도 5 mM, ○—○: β -1,3-글루칸 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ▲—▲: 20 mM 트리스 완충액). Ca^{2+} 존재 하에서 β -1,3-글루칸이 존재하는 경우 폐놀옥시데이즈 활성이 관찰되었다.

<46> 실시예 2.

<47> 페놀옥시데이즈 조성물이 β -1,3-글루칸을 특이적으로 검출하는지 알아 보기 위하여, 다양한 당을 시료로 사용하여, 위에 기재된 방법에 따라 멜라닌 생성 반응을 수행하였다. 400 nm에서 흡광도를 측정하여 생성된 멜라닌 양을 측정한 결과, 페놀옥시데이즈 조성물은 β -1,3-글루칸 존재하에서만 유의성 있게 멜라닌을 생성하였다. 그 결과를 표 1에 나타낸다.

<48> 【표 1】

| 당 | 결합종류 | 흡광도(400nm) |
|-------------------|---------------------------|------------|
| D(+) 글루코오스 | | 0.211 |
| 셀룰로오스 | β -1,4 | 0.240 |
| 말토오스 | α -1,4 | 0.237 |
| 덱스트란 | α -1,6 | 0.290 |
| 라미나린 | β -1,3 β -1,6 | 0.292 |
| 자이모산 | β -1,3 | 3.616 |
| 커들란 | β -1,3 | 3.352 |
| 20 mM 트리스(pH 8.0) | | 0.208 |

<49> 실시예 3.

<50> 딱정벌레목 갈색거저리에서 채취한 체액 50m1을 203,006 g 속도로 4 °C에서 4시간 원심분리한 후 상등액을 올트라필트레이션(cut off: 10,000)하여 3m1까지 농축하였다. Toyopearl CM-650M 레진을 1x11 cm 컬럼에 충진시키고 50 mM 트리스/5 mM EDTA 완충액(pH 6.5)으로 평형화시킨 후 약 300 mg의 단백질을 포함하는 시료를 3 m1의 IPS 용액에 용해시켜 0.03 mL/분의 속도로 로딩하였다. 50 mM 트리스/5 mM EDTA 완충액(pH 6.5)을 0.17 mL/분의 속도로 용출시켰다. 용출된 각 분획에 대해 280 nm에서 흡광도를 측정하여 단백질 농도를 조사하고, β -1,3-글루칸

용액을 사용한 4-MC/4-HP 발색 반응을 통해 β -1,3-글루칸이 있을 때 발색되는 분획만을 모아 페놀옥시데이즈 조성물을 얻었다. 얻어진 분획을 사용하여, 최종 Ca^{2+} 농도를 0 mM과 5 mM로 하고, β -1,3-글루칸 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 함유하는 시료 10 μl 을 사용하여 4-MC/4-HP 발색 반응을 수행하였다. 결과를 도 2에 나타낸다(■—■: 최종 칼슘 농도 5 mM + β -1,3-글루칸 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, □—□: 최종 칼슘 농도 5 mM, ●—●: β -1,3-글루칸 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ▲—▲: 20 mM 트리스 완충액)

<51> 윗 곡선: 최종 칼슘 농도 5 mM + β -1,3-글루칸 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 중간 곡선: 최종 칼슘 농도 5 mM, 아래 곡선: β -1,3-글루칸 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Ca^{2+} 존재 하에서 β -1,3-글루칸이 존재하는 경우 페놀옥시데이즈 활성이 관찰되었다.

<52> 실시예 4

<53> 한국산 참검정굼벵이(Holotrichia diomphalia) 유충에서 분리한 플라즈마 45 ml 을 203,006 g 속도로 4 °C에서 4시간 원심분리하여 얻은 상동액 40 ml을 울트라 필트레이션(cut off: 10,000)하여 3 ml로 농축하였다. 50 mM 트리스-HCl/20 mM EDTA 완충액(pH 6.5)으로 평형화시킨 Toyopearl HW-55S 컬럼(1.4 x 50 cm)에 로딩하였다. 50 mM 트리스-HCl/20 mM EDTA 완충액(pH 6.5)으로 10.5 mL/시간의 속도로 용출시키면서 3.5 ml씩 분획하여 280 nm에서 흡광도를 측정하여 단백질 농도를 조

사하였다. β -1,3-글루칸 용액을 사용한 4-MC/4-HP 발색 반응을 통해 β -1,3-글루칸이 있을 때 발색되는 분획만을 모아 페놀옥시데이즈 조성물을 얻었다. 얻어진 페놀옥시데이즈 조성물을 사용하여, Ca^{2+} 의 존재 또는 부존재 하에서 β -1,3-글루칸 검출 능력을 확인하였다. 즉, 최종 Ca^{2+} 농도를 0 mM과 5 mM로 하고, β -1,3-글루칸 2 $\mu g/ml$ 함유하는 시료 10 μl 을 사용하여 4-MC/4-HP 발색 반응을 수행하여 페놀옥시데이즈 조성물을 얻었다. 결과를 도 3에 나타낸다(●—●: 최종 칼슘 농도 5 mM + β -1,3-글루칸 2 $\mu g/ml$, □—□: 최종 칼슘 농도 5 mM, ○—○: β -1,3-글루칸 2 $\mu g/ml$, ▲—▲: 20 mM 트리스 완충액). 칼슘 이온 및 칼슘 이온 존재하에서의 β -1,3-글루칸에 의해 페놀옥시데이즈 활성이 관찰되었다.

<54> 실시예 5

<55> 건강한 성인 남녀 11명과 입원 중인 암환자 50명으로부터 채혈하였다. 혈액에 혜파린을 처리한 후 원심분리하여 얻은 혈장을 β -1,3-글루칸 검출용 시료로 사용하였다.

<56> 환자로부터 얻은 혈장 10 μl 에 실시예 1에서 얻은 페놀옥시데이즈 조성물 10 μl 을 섞어 4-MC/4-HP 발색 반응을 수행하였다. 520nm에서 흡광도를 측정하고, 표준곡선으로부터 시료에 존재하는 β -1,3-글루칸의 양을 구하였다. 건강한 성인 남녀(11명)로부터 채혈한 혈장에서는 β -1,3-글루칸이 거의 검출되지 않았다. 항암치료로 인하여 면역성이 감소된 고형종양(solid tumor)과 혈액종양(hematogenic tumor)을 가진 환자들은 염증성 질환 환자들과 비교하여 현저히 높은 β -1,3-글루칸을 보였다.

칸 농도를 나타내었다(도 4, 팔호안의 숫자는 실행한 실험의 수를 나타내며 β -1,3-글루칸의 농도는 평균치 \pm SEM임). 도 4에서 기타로 표시된 환자들은 염증성 질환만 가지고 종양은 없는 환자들이다. 도 5에 나타난 바와 같이 염증성 질환 환자들의 경우 β -1,3-글루칸이 거의 검출되지 않았고, 종양과 염증성 질환을 동시에 가지고 있는 환자의 경우 그 값이 더욱 높게 나타났다(팔호안의 숫자는 실행한 실험의 수를 나타내며 β -1,3-글루칸의 농도는 평균치 \pm SEM임). 후자의 경우는 종양만 있는 환자에 비해 종양과 염증성 질환을 동시에 가지고 있는 환자의 면역성이 더욱 떨어져 진균 감염 정도가 높은 탓으로 추측된다.

<57> Candidiasis가 있는 것으로 확진된 환자의 경우 β -1,3-글루칸 농도는 더욱 높았고 Candidiasis 환자 중 항진균 치료를 받고 있는 환자들에서는 유의하게 β -1,3-글루칸 농도가 낮았다(도 6, 팔호안의 숫자는 실행한 실험의 수를 나타내며 β -1,3-글루칸의 농도는 평균치 \pm SEM임). 본 발명의 조성물을 사용하여 시료 내의 β -1,3-글루칸 농도를 측정함으로써 유효성 있게 진균 감염 여부를 진단할 수 있음을 알 수 있다.

【발명의 효과】

<58> 본 발명에 의해 진균 감염 여부를 초기에 진단할 수 있다. 면역기능이 저하된 환자들에게 초기에 진균 감염 여부를 판단하여 적절한 항진균제를 투여함에 의해 진균 감염으로 인한 사망을 줄일 수 있으며, 수산 양식업 등에서 곰팡이 감염에 대해 초기에 조치를 취할 수 있어 피해를 감소시킬 수 있다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

칼슘 존재하에서, β -1,3-글루칸에 의해 페놀옥시데이즈 활성을 나타내는 진균
감염 진단용 조성물.

【청구항 2】

곤충의 체액 또는 플라즈마인 시료를 얻고, 얻어진 시료를 상기 시료 및 분리
공정에 존재하는 칼슘이온을 킬레이팅하기에 충분한 킬레이팅제를 함유하는 용매
또는 완충액로 처리하여 분획을 얻고, 얻어진 분획 중 칼슘 이온 존재하에서 β
-1,3-글루칸에 의해 페놀옥시데이즈 활성을 나타내는 분획을 선택하는 것으로 이
루어지는, 칼슘 존재하에서, β -1,3-글루칸에 의해 활성화되는 페놀옥시데이즈
조성물의 제조방법.

【청구항 3】

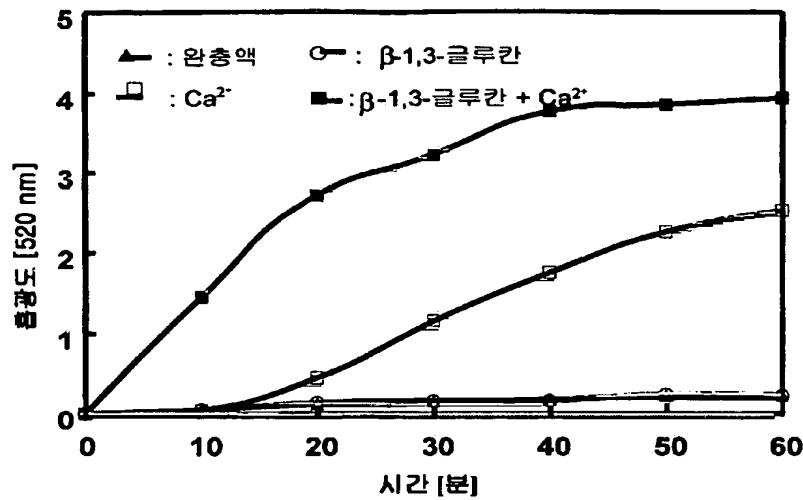
검체로부터 시료를 채취하고, 상기 시료에 칼슘 이온 존재하에서 β -1,3-글루칸
에 의해 페놀옥시데이즈 활성을 나타내는 조성물과 칼슘 이온을 첨가하고, 상기
시료에서의 페놀옥시데이즈 활성을 측정하는 것으로 이루어지는, 진균 감염 진단
방법.

【청구항 4】

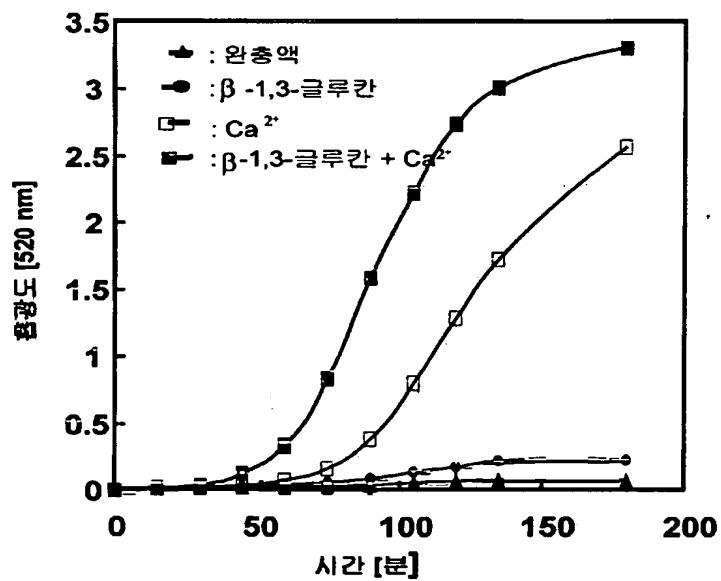
칼슘 이온 존재하에서 β -1,3-글루칸에 의해 페놀옥시데이즈 활성을 나타내는
조성물을 함유하는 진균 감염 진단용 키트.

【도면】

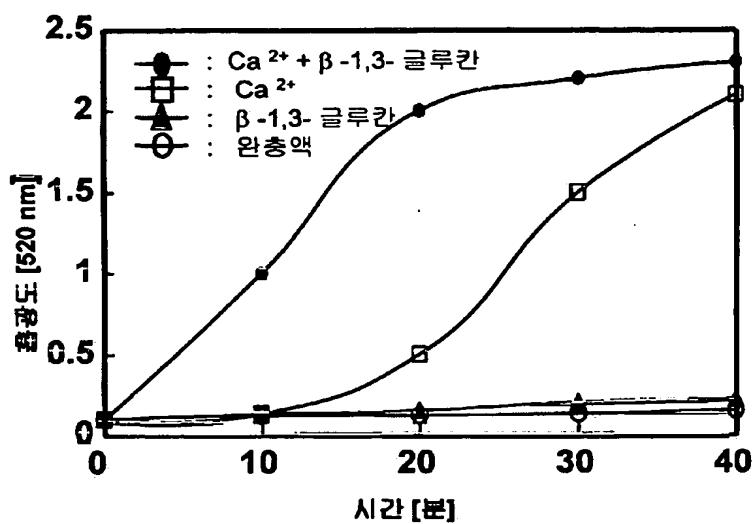
【도 1】



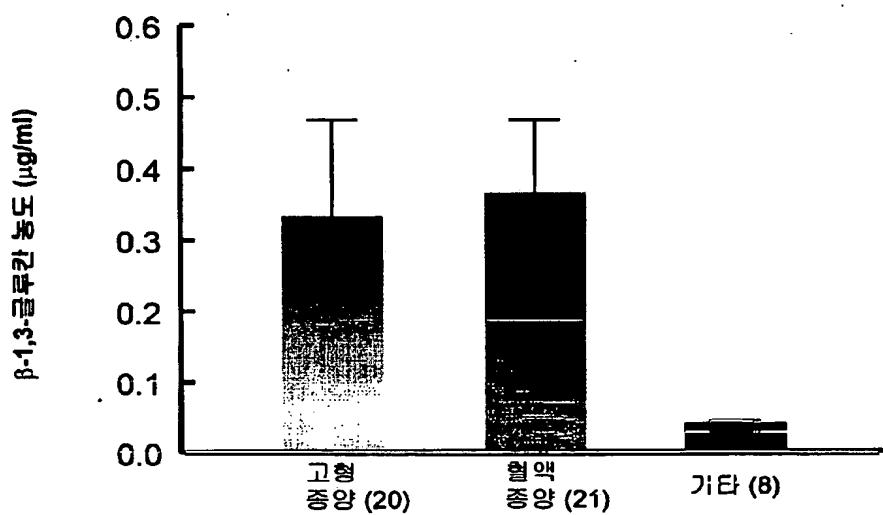
【도 2】



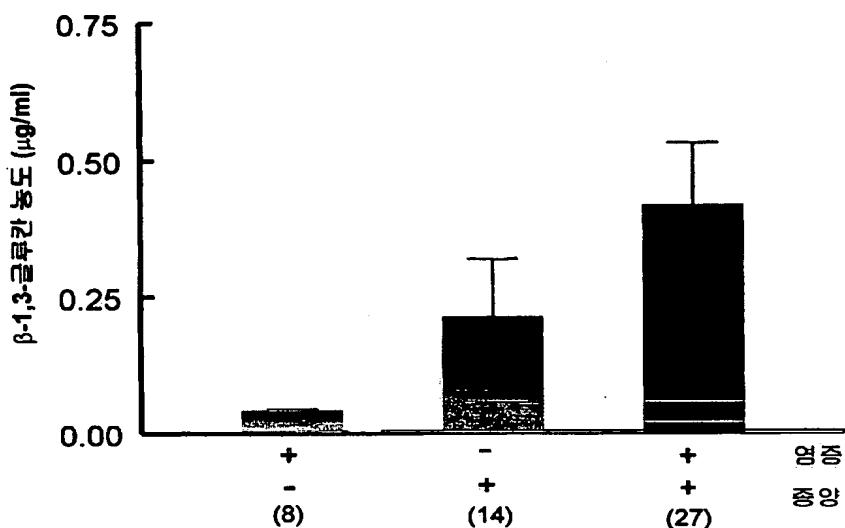
【도 3】



【도 4】



【도 5】



【도 6】

